

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Freien Universität
Berlin

Direktor: Professor Dr.med. Dr.rer.nat. Ernst S c h ü t t e

Biochemische Untersuchungen
an Mg-arm gewachsenen Zellen
von E. coli

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Mariß
aus Berlin

1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550821_0042

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Freien Universität
Berlin

Direktor: Professor Dr.med. Dr.rer.nat. Ernst S c h ü t t e

Biochemische Untersuchungen
an Mg-arm gewachsenen Zellen
von E. coli

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Peter Mariß
aus Berlin

Dekan: Professor Dr.med. Hans Heinz N a u m a n n

Referent: Priv.Do. Dr.med. Theodor G ü n t h e r

Korreferent: Professor Dr.med.

Dr.rer.nat. Heinz T i e d e m a n n



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 24.Juni 1969

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	S. 1
Ergebnisse	
I. Mg-Aufnahme in E. coli	S. 4
II. Glykolyse von Mg-arm gewachsenen Zellen	S. 4
III. Atmung von Mg-arm gewachsenen Zellen	S. 14
IV. K-Transport	S. 18
V. Reversibilität	S. 27
Diskussion	S. 33
Material und Methoden	S. 40
Zusammenfassung	S. 53
Literatur	S. 54

Biochemische Untersuchungen an Mg-arm gewachsenen Zellen von E. coli

Einleitung

Mg gehört zu den lebensnotwendigen Elementen. Mg aktiviert zahlreiche Enzyme (1). Zwischen Enzymaktivität und pMg , den man in Analogie zum pH als den negativen dekadischen Logarithmus der Mg-Ionen-Konzentration definiert hat, besteht eine glockenförmige Abhängigkeit. Diese ist die Summe aus zwei übereinandergelagerten S-förmigen Kurven: 1.) der Zunahme der Aktivität als $f(pMg)$ und 2.) der Abnahme der Aktivität (Hemmung) als $f(pMg)$. Die Hemmung der Mg-abhängigen Enzyme bei hohen Mg-Konzentrationen erfolgt durch unspezifische Bindung des Mg an Protein (vgl. Mg-Bindung an Serumalbumin).

Für die Aktivierung Mg-abhängiger Enzyme gibt es mehrere Möglichkeiten. 1.) Mg^{2+} reagiert mit dem negativ geladenen Substrat (hauptsächlich ATP) zum Mg-Substrat, das als eigentliches Substrat vom Enzym umgesetzt wird. Das Mg wäre hierbei durch Verminderung der negativen Ladung an der Bindung des Substrates beteiligt. 2.) Mg reagiert mit dem Enzym zum aktiven Mg-Enzym-Komplex, der die aktive Konformation des Enzyms darstellt. 3.) Das im Enzym-Substrat-Mg-Komplex komplex gebundene Mg erhöht die Polarität der zu spaltenden Bindungen und greift so direkt in die Reaktion ein.

Diese drei Möglichkeiten können auch kombiniert auftreten, in der Weise, daß z.B. die Bindung des Mg-Substrat-Komplexes die aktive Konformation des Enzyms herstellt oder daß das Substrat über das an das Enzym gebundene Mg an den Mg-Enzym-Komplex gebunden wird. Mg kann in jedem Fall noch zusätzlich die zu spaltenden Bindungen labilisieren (1).

Außerdem stabilisiert Mg biologische Strukturen wie Mitochondrien und Ribosomen, indem es negativ geladene Gruppen wie Carboxyl-, Sulfat- und Phosphatgruppen, die sich in verschiedenen Molekülen befinden können, miteinander verbindet. Das äußert sich z.B. daran, daß Lebermitochondrien von Ratten, die unter Mg-Mangel

gezüchtet wurden, geschwollen sind (2) und eine Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung aufweisen (3), oder daß Mg den Schmelzpunkt von DNS erhöht (4).

Bei niedriger Mg-Konzentration dissoziieren 70 S-Ribosomen in 50 S- und 30 S-Untereinheiten (5). 50 S- und 30 S-Ribosomen sind aber wahrscheinlich nicht mehr zur Proteinsynthese fähig (6). Dies ist eine der Möglichkeiten, wie Mg in die Proteinbiosynthese eingreift.

Außerdem können bei einer Änderung der Mg-Konzentration durch ein bestimmtes Triplet andere Aminosäuren codiert werden (7). Diesen Vorgang nennt man "ambiguity". Er kann wie folgt erklärt werden.

Mg ist an der Bindung der Amino-acyl-t-RNS an den Ribosom-m-RNS-Komplex beteiligt. Bei der Codierung lagert sich die m-RNS an die 30 S-Untereinheit des Ribosoms an (8), während sich die t-RNS an die 50 S-Untereinheit des Ribosoms bindet (9). Normalerweise erfolgt die Bindung des Codons der m-RNS mit dem Anticodon der t-RNS durch Wasserstoffbrücken zwischen drei jeweils komplementären Basen. Bei hoher Mg-Konzentration kann die Bindung des Codons an das Anticodon schon durch An-einanderlagerung zweier Basenpaare (Dupletts) erfolgen, wahrscheinlich weil Mg, das bei hoher Mg-Konzentration an die 50 S-Untereinheit gebunden ist, zu einer zusätzlichen Vernetzung der m-RNS mit der t-RNS beiträgt. Hierdurch verliert die Codierung ihre Spezifität, so daß "falsche" Aminosäuren durch den gleichen messenger in Protein eingebaut werden können.

Tierische Zellen haben einen intrazellulären pMg von etwa 3 (1). Bei dieser intrazellulären Mg-Ionen-Konzentration sind soweit bisher geprüft - die Mg-abhängigen Enzyme gerade optimal oder nahezu optimal aktiviert. Eine Erhöhung der intrazellulären Mg-Ionen-Konzentration hat deshalb wegen der glockenförmigen pMg-Abhängigkeit der Enzymaktivität keinen wesentlichen Einfluß auf die Aktivität Mg-benötigender Enzyme. Erst bei sehr hoher Mg-Ionen-Konzentration tritt eine unspezifische Enzymhemmung durch Mg ein. Eine Änderung des Stoffwechsels durch Änderung der intrazellulären Mg-Ionen-konzentration kann daher nur bei ihrer Abnahme erfolgen.

Aus der pMg -Abhängigkeit Mg -benötigender Enzyme und der durchschnittlichen Mg -Ionen-Konzentration in der Zelle lassen sich aber keine Vorhersagen auf regulierende Mg -abhängige Reaktionen bei Mg -Mangel machen; diese können nur direkt bestimmt werden, da die Mg -Ionen-Konzentration am Enzymort in der Zelle nicht meßbar ist (1,10). Bei einer Abnahme des Gesamt- Mg -Gehaltes wird sich die intrazelluläre Mg -Ionen-Konzentration nicht proportional ändern, weil das Mg^{2+} in der Zelle gepuffert ist und der Mg -Puffer Mg -Ionen nachliefern kann (10).

Tierische Zellen im Mg -Mangelzustand sind nur schwierig zu erhalten. Der Mg -Gehalt sinkt dabei nicht in allen Organen ab und die erreichbaren Abnahmen sind nur geringfügig (11). Ascites-Tumorzellen z.B. haben auch bei Mg -freier Ernährung der Wirtstiere keinen niedrigeren Mg -Gehalt als bei ausreichender Zufuhr (11). Dagegen lassen sich Mg -arme Bakterien leicht durch Züchtung in Mg -armen Medien gewinnen (12). An diesen Zellen, bei denen im Gegensatz zu tierischen Organismen durch Mg -Mangel hervorgerufene zusätzliche sekundäre Veränderungen und hormonelle Gegenregulationen nicht vorhanden sein können, untersuchten wir die Stoffwechselveränderungen, die bei Mg -Verarmung auftreten.

Ergebnisse

I. Mg-Aufnahme in E. coli

Zur Charakterisierung der in den Versuchen verwendeten Zellen bestimmten wir zunächst ihren Mg-Gehalt. Coli-Zellen, die in einem Mg-reichen Medium ($[Mg^{2+}] = 3 \cdot 10^{-3} M$) gewachsen sind, haben 17,0 mMol Mg^{2+} /kg Feuchtgewicht. Zellen, die über Nacht im gleichen Medium aber mit $3 \cdot 10^{-7} M$ Mg^{2+} gewachsen sind, weisen nur einen Mg-Gehalt von 5,5 mMol/kg Feuchtgewicht auf.

Inkubiert man Mg-reich bzw. Mg-arm gewachsene Zellen in einem Mg^{2+} ($10^{-3} M$) - und glukosehaltigen Medium, so steigt unter Wachstumsbedingungen als auch ohne Wachstum bei beiden Zelltypen die Gesamt-Mg-Konzentration jeweils auf den gleichen Wert von 28 mMol/kg Feuchtgewicht an (Abb. 1).

II. Glykolyse von Mg-arm gewachsenen Zellen

Zwischen Mg-arm und Mg-reich gewachsenen Zellen lassen sich Stoffwechselunterschiede messen. Über Nacht in Mg-armem Medium ($3 \cdot 10^{-7} M$ Mg^{2+}) gewachsene Zellen bauen anaerob und aerob weniger Glukose ab als Mg-reich gewachsene Zellen (Tab. 1). Bei Mg-armen Zellen nimmt der Glukoseverbrauch beim Übergang von aeroben zu anaeroben Bedingungen nur um ca. 20 % zu, bei den Kontrollzellen dagegen um 50 bis 70 %. Gleichzeitig ist der aerobe Glukoseverbrauch durch Entkoppler nur noch wenig zu steigern. Die Änderungen im Glukosestoffwechsel scheinen spezifisch zu sein für Zellen, die unter Mg-Mangelbedingungen gewachsen sind. Bei Zellen von E. coli, die unter K^{+} -, PO_4^{3-} -, NH_4^{+} - und SO_4^{2-} -Mangelbedingungen gewachsen sind, war der aerobe und anaerobe Glukoseverbrauch (Tab. 2) (sowie die Atmung) gegenüber Kontrollzellen unverändert.

Bei den Mg-arm gewachsenen Zellen kommt es unter aeroben Bedingungen außerdem zu einer stärkeren Anhäufung von Milchsäure (Tab. 3).

Um zu entscheiden, ob eine verringerte Aktivität bei den glykolytischen Enzymen für den erniedrigten Durchsatz durch die

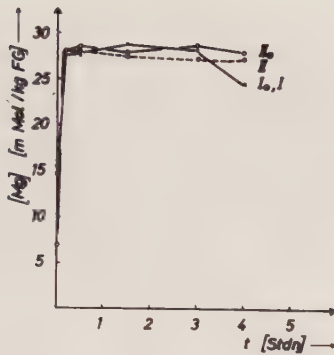


Abb. 1:

Mg-Aufnahme in Mg-reich (x) und Mg-arm (o) gewachsene Zellen von *E. coli*. Die Zellen wurden gezüchtet, gesammelt, einmal gewaschen und in folgendem Ansatz inkubiert, Volumen 30 ml, Angabe in Endkonzentrationen.

Wachstumsmedium: NaCl 80 mM, KCl 30 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM, NH_4Cl 15 mM, K_2HPO_4 30 mM, KH_2PO_4 30 mM, Glukose 0,5 g%, l-Leucin 100 mg/l, l-Histidin 100 mg/l, l-Methionin 100 mg/l, MgCl_2 1 mM.

Medium ohne Wachstum, obiges Medium ohne Ammoniumsalze und ohne Aminosäuren.

Zur angegebenen Zeit wurde ein Aliquot entnommen, 10 Min. bei 4300 g zentrifugiert, einmal zur Entfernung des extrazellulären Mg gewaschen und dann Mg in der Zelle bestimmt (Einzelheiten s. Methode S. 41).

- I Mg-reiche Zellen im Wachstumsmedium
- I_o Mg-reiche Zellen im Medium ohne Wachstum
- II Mg-arme Zellen im Wachstumsmedium
- II_o Mg-arme Zellen im Medium ohne Wachstum

Tabelle 1:

Glukoseverbrauch Mg-reich und Mg-arm gewachsener Zellen von *E. coli* unter verschiedenen Bedingungen. Die über Nacht gewachsenen Bakterien wurden einmal in bidest. Wasser gewaschen und in 2 ml 0,15M Trispuffer, pH 7,2, der 0,045M KCl und 0,06M Na-Phosphat, pH 7,2, enthielt, bei 37°C 90 Min. inkubiert. Proteingehalt der Zellsuspension 0,5 mg, Glukosekonzentration 100 mg%. Der Glukoseverbrauch wurde enzymatisch mit Glukoseoxydase und Peroxydase (Fa. Boehringer) bestimmt. Angaben in $\mu\text{Mol/mg Prot.} \cdot \text{Std.}$

Inkubation	aerob	Glukose		
		+ N ₂	+ KCN 10 ⁻³ M	+ Azid 10 ⁻² M
Mg-reich	6,0 $\pm$ 0,11	9,2 $\pm$ 0,75	10,1 $\pm$ 0,48	10,2 $\pm$ 0,36
Mg-arm	4,0 $\pm$ 0,26	4,7 $\pm$ 0,42	5,1 $\pm$ 0,31	4,7 $\pm$ 0,33

	Glukose		
	+ 2,4-DNP 10 ⁻³ M	+ 2,4-DNP 3 · 10 ⁻⁴ M	+ 2,4-DNP 10 ⁻⁴ M
Mg-reich	9,2 $\pm$ 0,91	8,1 $\pm$ 0,96	7,2 $\pm$ 0,36
Mg-arm	3,4 $\pm$ 0,10	4,3 $\pm$ 0,40	3,9 $\pm$ 0,22

Tabelle 2:

Aerober und anaerober Glukoseverbrauch K-, PO_4 - , SO_4 - und NH_4 -arm gewachsener Zellen von E. coli. Die Zellen wurden über Nacht in Mg-reichen aber K-, PO_4 -, SO_4 - bzw. NH_4 -armen Medien gezüchtet (genaue Zusammensetzung der Medien s.Meth. S.48). Versuchsanordnung s. Tab. 1. Angaben in $\mu\text{Mol/mg Prot. Std.}$

Zellen	Glukose aerobe Kontrolle	Glukose + KON 10^{-3}M
K-arm	$5,3 \pm 0,6$	$9,3 \pm 1,2$
PO_4 -arm	$5,4 \pm 0,7$	$8,9 \pm 0,9$
SO_4 -arm	$5,8 \pm 0,4$	$9,2 \pm 1,0$
NH_4 -arm	$6,4 \pm 0,5$	$10,1 \pm 1,0$

Tabelle 3:

Endprodukte des Glukoseabbaus Mg-reich und Mg-arm gewachsener E. coli-Zellen unter aeroben und anaeroben Bedingungen. Die Zellen (ca. 4 mg Protein) wurden 90 Min. bei 37°C in 3 ml Inkubationsmedium (s. Tab. 1) mit 1 g % Glukose inkubiert, danach in Eis-Kochsalzmischung auf 0°C gekühlt und bei 6000 g abzentrifugiert. Im Überstand wurden Glukose, Milchsäure, Äthanol und Ameisensäure, wie in der Methode beschrieben, bestimmt. Angaben in $\mu\text{Mol/mg Prot.} \cdot \text{Std.}$

Zellen	Inkubation	Glukose- verbrauch	Milchsäure- bildung	Äthanol- bildung	Ameisen- säurebil- dung
Mg-reich	aerob	6,1 $\pm$ 0,51	0,24 $\pm$ 0,06	0,35 $\pm$ 0,07	2,0 $\pm$ 0,25
	anaerob KCN 10 ⁻³ M	11,4 $\pm$ 1,3	8,5 $\pm$ 1,0	0,41 $\pm$ 0,05	1,3 $\pm$ 0,16
Mg-arm	aerob	4,2 $\pm$ 0,32	0,67 $\pm$ 0,21	0,25 $\pm$ 0,05	1,8 $\pm$ 0,11
	anaerob KCN 10 ⁻³ M	5,2 $\pm$ 0,53	5,1 $\pm$ 0,36	0,33 $\pm$ 0,07	1,5 $\pm$ 0,17

Glykolyse verantwortlich ist, untersuchten wir die Aktivität dieser Enzyme. Es zeigte sich, daß der Gehalt an glykolytischen Enzymen bei Zellen, die in Mg-armem und glukosehaltigem Medium gewachsen sind, gegenüber dem Enzymgehalt von Kontrollzellen entweder unverändert oder etwas erhöht ist (Tab. 4). Die Änderung der Enzymaktivität hängt außerdem vom Substrat (Glukose oder Glycerin) und den Züchtungsbedingungen (aerob oder anaerob) ab. Die aufgetretenen Unterschiede waren bei den getesteten glykolytischen Enzymen gering und betrugen das 2 - 3fache.

Die Aktivität der Glukosepermease, die bei E. coli für die Aufnahme von Glukose nötig ist (13), war bei den Mg-armen Zellen etwa auf die Hälfte abgesunken (Abb. 2), unabhängig davon, ob die Versuche mit Glukose oder Glycerin als Substrat oder ohne Substratzusatz durchgeführt wurden. Die Pyruvat-Dekarboxylase-Aktivität war stark verringert. Sie betrug bei Mg-reich gewachsenen Zellen 753 nMol/mg Prot.·Min., bei Mg-arm gewachsenen Zellen jedoch nur 35 nMol/mg Prot.·Min.

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten und pH-Optima ergab für die untersuchten Enzyme (Pyruvat-Dekarboxylase und NAD-abhängige Glycerophosphat-Dehydrogenase) aus Mg-arm und Mg-reich gewachsenen Zellen gleiche Werte, so daß die Abnahme der Enzymaktivität auf eine Abnahme der Enzymmenge zurückzuführen ist.

Um auszuschließen, daß sich bei Mg-armen Zellen die Aktivierbarkeit der Mg-abhängigen Enzyme geändert hat, verglichen wir die pMg-Abhängigkeit der Hexokinase, Phosphofruktokinase und Isozitat-Dehydrogenase aus Mg-reich und Mg-arm gewachsenen Zellen (Abb. 3a, 3b und 3c). Es zeigte sich, daß die untersuchten Enzyme bei beiden Zelltypen in gleicher Weise vom pMg abhängig waren.

Die Änderung einer Enzymmenge muß aber noch keine Änderung einer Stoffwechselleistung bedingen, denn die Durchsatzgeschwindigkeit durch eine Reaktionskette, an der mehrere Enzyme beteiligt sind, ist bestimmt durch die langsamste Reaktion bzw. durch das Enzym in der Reaktionskette mit der niedrigsten Aktivität. Die im optischen Test in vitro gemessene Aktivität eines Enzyms ist

Tabelle 4:

Enzymaktivitäten m μ Mol/mg Prot. Min. in E. coli nach Züchtung in Mg-reichem und Mg-armem Medium mit 0,5 % Glukose unter aeroben (95 % O₂ - 5 % CO₂) und anaeroben (95 % N₂ - 5 % CO₂) Bedingungen sowie 0,5 % Glycerin unter aeroben Bedingungen. Die Enzymaktivitäten wurden im 120 000 g Überstand nach Aufschließen der Zellen mit Ultraschall bestimmt. (Einzelheiten s. Methode).

		Glukose aerob	Glukose anaerob	Glycerin aerob
HK	Mg-r	42,1 $\pm$ 3,1	20,5 $\pm$ 4,2	34,5 $\pm$ 6,8
	Mg-a	96,4 $\pm$ 13,3	71,9 $\pm$ 10,5	18,5 $\pm$ 3,8
PFK	Mg-r	433 $\pm$ 52	675 $\pm$ 136	263 $\pm$ 27
	Mg-a	736 $\pm$ 59	593 $\pm$ 93	231 $\pm$ 25
ALD	Mg-r	288 $\pm$ 26	497 $\pm$ 33	233 $\pm$ 25
	Mg-a	271 $\pm$ 27	351 $\pm$ 21	162 $\pm$ 9
ENOL	Mg-r	225 $\pm$ 25	1679 $\pm$ 86	429 $\pm$ 36
	Mg-a	627 $\pm$ 66	846 $\pm$ 27	689 $\pm$ 91
PK	Mg-r	37,7 $\pm$ 5,3	97,9 $\pm$ 22,9	36,6 $\pm$ 3,4
	Mg-a	59,6 $\pm$ 12,9	66,0 $\pm$ 14,6	40,0 $\pm$ 9,9
LDH	Mg-r	76,4 $\pm$ 0,6	402 $\pm$ 18	244 $\pm$ 43
	Mg-a	90,9 $\pm$ 13,5	235 $\pm$ 38	234 $\pm$ 19
Glc-6-P-DH	Mg-r	187 $\pm$ 44	101 $\pm$ 13,3	134 $\pm$ 15
	Mg-a	150 $\pm$ 6	175 $\pm$ 12	134 $\pm$ 24
ICDH	Mg-r	443 $\pm$ 47	14,2 $\pm$ 5,4	343 $\pm$ 37
	Mg-a	191 $\pm$ 21	35,9 $\pm$ 9,8	186 $\pm$ 32
ADH	Mg-r	9,9 $\pm$ 2,4		
	Mg-a	20,7 $\pm$ 3,7		
GDH	Mg-r	120 $\pm$ 17		
	Mg-a	6,5 $\pm$ 0,8		
Pyr-DK	Mg-r	753 $\pm$ 23		
	Mg-a	35 $\pm$ 4,7		

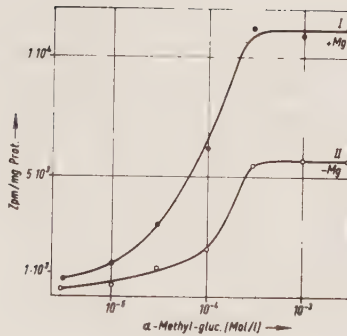


Abb. 2:

Aktivität der Glukosepermease Mg-reich (I) und Mg-arm (II) gewachsener *E. coli*-Zellen. Die Glukosepermease-Aktivität wurde durch die nach 5 Min. Inkubation bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen von $[^{14}\text{C}]$ α -Methyl-glucopyranosid aufgenommene ^{14}C -Aktivität gemessen. Die spezifische Aktivität des α -Methyl- $[\text{u-}^{14}\text{C}]$ glucosids betrug $6,58 \mu\text{C/mMol}$. Konzentration der Zellsuspension: $0,6 \text{ mg Protein/ml}$. (Einzelheiten s. Methode S. 44).

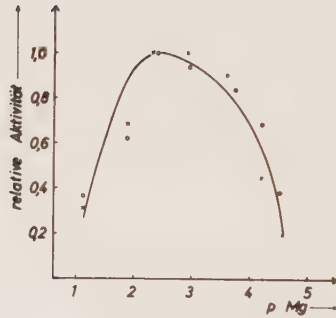


Abb. 3a:

pMg-Abhängigkeit der Hexokinase bei Mg-reich (x) und Mg-arm (o) gewachsenen Zellen von *E. coli*, Testansatz s.Methode S.42, Berechnung von pMg nach Formel s.Methode S.45.

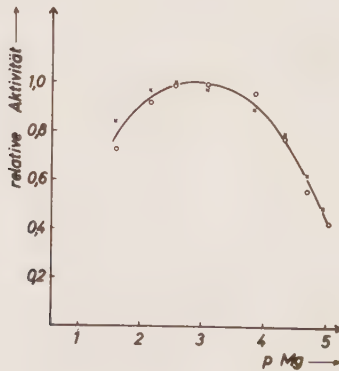


Abb. 3b:

pMg-Abhängigkeit der Phosphofruktokinase bei Mg-reich (x) und Mg-arm (o) gewachsenen Zellen, Testansatz s.Methode S.42, Berechnung des pMg nach Formel s.Methode S.45.

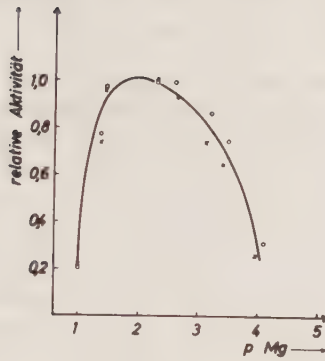


Abb. 3c:

pMg-Abhängigkeit der Isozitatdehydrogenase bei Mg-reich (x) und Mg-arm (o) gewachsenen Zellen, Testansatz s. Methode S.42, Berechnung des pMg nach Formel s. Methode S.45.

nicht entscheidend für die Aktivität eines Enzyms in der Zelle, da die in vitro-Aktivität unter Substrat- und Cofaktorsättigung gemessen wird. Intrazellulär liegen aber Substrate und Cofaktoren nicht bei jedem Enzym in der Sättigungskonzentration vor. Errechnet man aus den Konzentrationen der Reaktionspartner die Massenwirkungskonstante für die einzelnen Enzyme einer Reaktionskette, so kann man daraus auf ihre Aktivität untereinander schließen. Je mehr sich die Massenwirkungskonstante von der Gleichgewichtskonstanten unterscheidet, desto stärker weicht die Reaktion vom Gleichgewicht ab, d.h. desto geringer ist die Aktivität des entsprechenden Enzyms.

Zur Charakterisierung der limitierenden Reaktion ermittelten wir daher die Zwischenstoffkonzentrationen bei Mg-arm und Mg-reich gewachsenen Zellen (Tab. 5a). Die Zwischenstoffkonzentrationen wurden nach 5 Min. Inkubation bestimmt, weil nach diesem Zeitpunkt der Glukoseverbrauch im "steady-state" ist (14). Bei Mg-verarmten Zellen ist unter den gewählten Versuchsbedingungen der Gehalt an Glc-6-P und Citrat stark abgesunken und der Gehalt an P-Enolpyruvat etwas erniedrigt. Die Konzentrationen von Fru-1,6-P₂ und Pyruvat sind erhöht, die von Dihydroxyaceton-P, Glycerinaldehyd-P und 2-P-Glycerat sind praktisch unverändert. Der Gehalt an ATP nahm geringfügig, der an ADP etwas stärker ab, während die AMP- und PO₄³⁻-Konzentration anstieg.

III. Atmung von Mg-arm gewachsenen Zellen

Außer der Glykolyse war auch der Durchsatz durch die Atmungskette verändert. Die unter Mg-Mangel gewachsenen Bakterien haben mit Glukose als Substrat eine wesentlich geringere Atmung (Tab. 6a). Dieser verringerte O₂-Verbrauch ist durch Entkoppler wie Azid oder 2,4 DNP nur noch geringfügig zu erhöhen. Um zu entscheiden, welcher Schritt innerhalb der Atmungskette für den verringerten Durchsatz bei Mg-armen Zellen verantwortlich ist, untersuchten wir die Atmung mit verschiedenen Substraten, die an bekannten charakteristischen Stellen in die Atmungskette eintreten.

Tabelle 5a:

Zwischenstoffkonzentrationen in Mg-reich und Mg-arm gewachsenen *E. coli*-Zellen. Diese (ca. 30 mg Protein) wurden 5 Min. bei 37°C in 30 ml Inkubationsmedium (s. Tab. 1) mit 0,1 % Glukose inkubiert, durch Eintauchen in flüssige Luft auf 0°C gekühlt, bei 6000 x g und 0°C abzentrifugiert, in 4 ml eiskühler 6proz. HClO₄ aufgenommen und unter Kühlen mit Ultraschall behandelt. Der Zellaufschluß wurde 30 Min. bei 120000 x g zentrifugiert. Im Überstand, der mit festem KHCO₃ neutralisiert wurde, wurden die Zwischenstoffkonzentrationen mit üblichen optischen Testen (s. Methoden) bestimmt. Angaben in µMol/g Prot.

Zwischenstoff	Mg-reich	Mg-arm
Glc-6-P	2,52 ± 0,62	0,64 ± 0,15
Dihydroxyaceton-P	1,28 ± 0,15	1,30 ± 0,10
Glycerinaldehyd-P	0,43 ± 0,04	0,53 ± 0,06
Fru-1,6-P ₂	3,75 ± 0,83	11,6 ± 0,6
2-P-Glycerat	1,13 ± 0,26	0,87 ± 0,12
P-Enolpyruvat	1,67 ± 0,15	1,06 ± 0,13
Pyruvat	3,77 ± 0,67	6,66 ± 0,83
Citrat	16,9 ± 0,66	4,10 ± 0,51
ATP	5,70 ± 0,77	5,0 ± 0,13
ADP	3,51 ± 0,36	2,06 ± 0,25
AMP	3,36 ± 0,54	5,03 ± 0,99
NADP	0,34 ± 0,05	0,28 ± 0,01
NADPH	0,10 ± 0,023	0,05 ± 0,01
NAD	3,80 ± 0,31	2,90 ± 0,17
NADH	0,10 ± 0,02	0,05 ± 0,01
PO ₄ ³	3,1 ± 0,57	4,5 ± 0,49

Tabelle 5b:

Die Massenwirkungskonstante K' der HK, PFK und PK bei Mg-reich und Mg-arm gewachsenen Bakterien wurden berechnet aus den entsprechenden Zwischenstoffkonzentrationen (Tab. 5a). Die Massenwirkungskonstante K' ergibt sich aus dem Produkt der Konzentrationen der Reaktionsprodukte dividiert durch das Produkt der Konzentrationen der Ausgangsstoffe.

	HK	PFK	PK
Mg-reich	0,31	0,91	3,66
Mg-arm	0,105	7,26	15,4

Tabelle 6a:

Atmung Mg-reich und Mg-arm gewachsener E. coli-Zellen mit verschiedenen Substraten. Über Nacht in glukosehaltigem Medium gewachsene Bakterien wurden einmal mit bidest. Wasser gewaschen und in 2 ml Inkubationsmedium mit 0,1 % Glukose bzw. 0,5 % l-Ascorbinsäure inkubiert. Der O_2 -Verbrauch wurde bei $37^\circ C$ manometrisch mit KOH im Einsatz ermittelt. Angaben in $\mu l O_2$ / mg Prot. • Std.

Inkubation	Glc Kontrolle	Glc + Azid $10^{-2}M$	Glc + DNP $10^{-3}M$
Mg-reich	$196 \pm 9,8$	352 ± 16	239 ± 27
Mg-arm	$121 \pm 7,1$	119 ± 17	100 ± 14

Inkubation	Glc + DNP $3 \cdot 10^{-4}M$	Glc + DNP $10^{-4}M$	l-Ascorbin- säure
Mg-reich	340 ± 18	$259 \pm 7,2$	94 ± 12
Mg-arm	$154 \pm 2,5$	130 ± 11	$34 \pm 7,9$

Mit l-Ascorbinsäure erhielten wir bei Mg-armen Zellen ebenfalls einen erniedrigten O_2 -Verbrauch, was auf eine Limitation der Atmungskette zwischen Cytochrom c und O_2 bei Mg-armen Zellen schließen läßt.

Die verminderte Atmung fanden wir bei Zellen, die auf Glycerin gewachsen waren, nicht. Nach Wachsen auf Glycerin hatten Mg-reich und Mg-arm gewachsene Zellen mit Glukose, Succinat, Glycerin-1-P und l-Ascorbinsäure den gleichen Sauerstoffverbrauch (Tab. 6b).

IV. K-Transport

Da bei Mg-arm gezüchteten Zellen die Glykolyse, Atmung und oxydative Phosphorylierung vermindert ist und da der K-Transport energieabhängig ist, untersuchten wir den K-Transport bei Mg-armen Zellen.

Wäscht man Zellen von E. coli in bidest. Wasser, so verlieren sie den größten Teil ihres Na- und K-Gehaltes. Bei nachfolgender Inkubation in einem K- und Glukose-haltigen Medium wird K sehr schnell gegen einen Konzentrationsgradienten in der Zelle wieder angereichert (15). Bei Mg-arm gezüchteten Bakterien ist diese K-Aufnahme in die Zelle erheblich vermindert (Abb. 4).

Bei diesen Zellen ist die intrazelluläre K-Konzentration (Abb. 4) (Tab. 7) immer nur geringfügig höher als die extrazelluläre K-konzentration. Die Mg-verarmten Zellen haben außerdem einen etwas höheren Wassergehalt (Tab. 7).

Im Na-Gehalt fanden wir zwischen Mg-armen und Mg-reichen Zellen keine Unterschiede (Abb. 4, Tab. 7).

Da der aktive K-Transport energieabhängig ist, verglichen wir die intrazellulären Nukleotidkonzentrationen. Tab. 5a zeigt, daß Mg-arm und Mg-reich gewachsene Zellen nur geringfügige Unterschiede in ihrem Nukleotidgehalt aufweisen.

Wir untersuchten weiter, ob eventuell die Verwendung von ATP für den aktiven K-Transport bei Mg-armen Zellen vermindert ist. Am Na-K-Transport tierischer Zellen scheint die

Tabelle 6b:

Atmung Glycerin-induzierter Mg-reich und Mg-arm gewachsener E. coli-Zellen mit verschiedenen Substraten. Angaben in $\mu\text{l O}_2 / \text{mg Prot.} \cdot \text{Std.}$ Über Nacht in glycerinhaltigem Medium gewachsene Zellen wurden wie in Tab. 6a angegeben behandelt. Substratkonzentration jeweils 0,5 proz.

Substrat	Glukose	Succinat	β -Hydroxy- butter- säure	Glycerin- 1-P	l-Ascorbin- säure
Mg-reich	197 $\pm$ 9,1	38 $\pm$ 3,1	28 $\pm$ 5,8	58 $\pm$ 4,4	51 $\pm$ 4,0
Mg-arm	182 $\pm$ 9,8	37 $\pm$ 3,9	31 $\pm$ 3,4	47 $\pm$ 2,0	54 $\pm$ 3,1

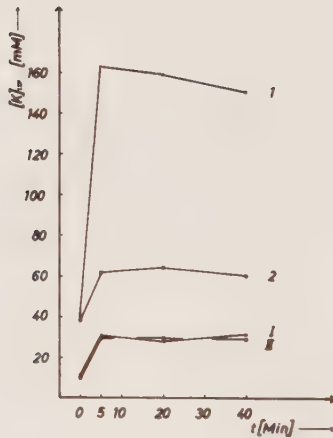


Abb. 4:

Aufnahme von Na und K in Mg-reich und Mg-arm gewachsenen E. coli. Mg-reich bzw. Mg-arm gewachsene Zellen wurden zweimal mit bidest. Wasser gewaschen und bei 37°C unter Begasung mit O₂-CO₂ inkubiert. Das Inkubationsmedium (30 ml) enthält: 0,15M Trispuffer pH 7,2, 45 mM KCl, 90 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ und 0,5% Glukose.

x Mg-reich gewachsene Zellen (1, I)
o Mg-arm gewachsene Zellen (2, II)
[Na]_{IZF} = I, II, [K]_{IZF} = 1, 2

Tabelle 7:

Na-, K- und H₂O-Gehalt Mg-reich und Mg-arm gewachsener Zellen von E. coli. Zweimal mit bidest. Wasser gewaschene Zellen mit einem Na-Gehalt von 10 mM und einem K-Gehalt von 25 mM wurden 10 Min. mit 0,5 % Glukose inkubiert (s. Meth. S. 47). Die extracellulären K-Konzentrationen betrugen 45 mM bzw. 4,5 mM.

	$[K]_{EZF} = 45 \text{ mM}$			$[K]_{EZF} = 4,5 \text{ mM}$		
	$[Na]_{IZF}$	$[K]_{IZF}$	H ₂ O	$[Na]_{IZF}$	$[K]_{IZF}$	H ₂ O
	mM		%	mM		%
Mg-reich	31,4	164,5	82,5	33,4	146,0	83,3
Mg-arm	32,8	68,5	89,5	36,0	24,5	89,5

Na-K-aktivierbare Membran-ATPase beteiligt zu sein. Wir bestimmten deshalb die Aktivität der (Membran-gebundenen) ATPase Mg-ärmerer *E. coli* und fanden, daß Mg-arm gewachsene Zellen die gleiche ATPase-Aktivität haben wie Mg-reich gewachsene Zellen (Tab. 8). Die ATPase scheint daher nicht für die starke Hemmung des K-Transportes verantwortlich zu sein.

Da der K-Transport in *E. coli* praktisch nur durch Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung (mit 2,4 DNP) gehemmt wird (15), untersuchten wir die Hemmbarkeit des K-Transportes bei Mg-reich und Mg-arm gewachsenen Zellen durch 2,4 DNP. 2,4 DNP hemmt bei Mg-reich gewachsenen Zellen den aktiven K-Transport mit Glukose oder Glycerin als Substrat (Tab. 9). Der erniedrigte K-Transport Mg-ärmerer Zellen wird durch 1 mM 2,4 DNP auf den Wert der extrazellulären K-Konzentration gesenkt.

E. coli hat als fakultativer Anaerobier unter anaeroben Bedingungen die gleiche hohe intrazelluläre K-Konzentration wie aerob (Tab. 9). Die ATP-Konzentrationen sind eher unter anaeroben Bedingungen bei Mg-reich und Mg-arm gewachsenen Zellen niedriger als aerob (Tab. 10).

2,4 DNP hemmt auch unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von 1 mM KCN den aktiven K-Transport (Tab. 9).

Bestimmt man die intrazelluläre K-Konzentration bei verschiedenen DNP-Konzentrationen, so findet man die gleiche Abhängigkeit von der DNP-Konzentration (Abb. 5).

Tabelle 8:

ATPase-Aktivität Mg-reich und Mg-arm gewachsener Zellen. Zweimal mit bidest. Wasser gewaschene intakte Zellen, das 120 000 g-Sediment und der Überstand des Ultraschall-Homogenats wurden 2 Std. bei 37°C mit 5 mM Mg-ATP in 0,1M Trispuffer pH 7,5 inkubiert. $[s] = 20 \text{ mM}$, $[K] = 0$. Der Ansatz (1,0 ml) wurde mit 0,5 ml 15% Trichloressigsäure (TCE) enteiweißt. In je 0,5 ml des TCE-Extraktes wurde das abgespaltene anorganische PO_4 nach Fiske und Subbarow (48) bestimmt.

	intakte Zellen	Sediment	Überstand
	$\mu\text{Mol PO}_4/\text{mg Prot.} \cdot \text{Std.}$		
Mg-reich	0,33	1,23	1,32
Mg-arm	0,40	1,37	1,18

Tabelle 9:

Intracellulärer K-Gehalt (in mM) Mg-reich und Mg-arm gewachsener E. coli B 163 unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit 0,5 % Glucose bzw. 0,5 % Glycerin ohne und in Gegenwart von 1 mM 2,4 DNP. Anaerobe Bedingungen wurden durch 1 mM KCN eingestellt. Die extracelluläre K-Konzentration betrug 45 mM, Inkubation: 10 Min. bei 37°C.

Inkubation Substrat	aerob				anaerob	
	Glucose	Gluc.	Glyc.	Glyc.	Gluc.	Gluc.
1 mM 2,4 DNP	-	+	-	+	-	+
Mg-reich	156,0	66,1	119,0	44,1	153,0	66,0
Mg-arm	72,2	47,3	57,0	45,0	73,5	46,9

Tabelle 10:

ATP-Gehalt (in $\mu\text{Mol}/100 \text{ mg Prot.}$) Mg-reich und Mg-arm gewachsener Zellen ohne und mit 2,4 DNP. Die Zellen wurden 5 Min. bei 37°C unter Begasung mit $\text{O}_2\text{-CO}_2$ inkubiert. Anaerobe Bedingungen durch 1 mM KCN. Anschließend wurden die Zellen mit flüssiger Luft auf 0°C gekühlt, abzentrifugiert, mit kalter 6 % HClO_4 aufgeschlossen und 35 Min. bei 120 000 g und 0°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit KHCO_3 neutralisiert und zur ATP-Bestimmung (Testkombination Fa.Boehringer) verwendet.

Inkubation	aerob		anaerob	
	-	+	-	+
0,1 mM 2,4 DNP	-	+	-	+
Mg-reich	0,57	0,20	0,37	0,18
Mg-arm	0,50	0,27	0,36	0,22

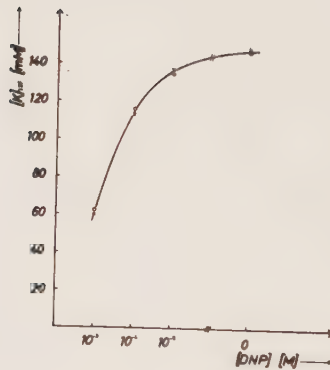


Abb. 5:

Intracelluläre K-Konzentration in Abhängigkeit von der 2,4 DNP-Konzentration unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

Über Nacht in Glukose-haltigem Normalmedium gewachsene Zellen wurden wie unter Abb. 4 angegeben behandelt.

x = aerobe Inkubation

o = anaerobe Inkubation (1 mM KCN)

V. Reversibilität der gemessenen Stoffwechselveränderungen

Um einen Einblick in die Entstehung der beschriebenen Stoffwechselveränderungen zu erhalten, untersuchten wir deren Rückbildung. Dazu ließen wir Mg-arme Zellen in Mg-haltigem Medium wachsen und entnahmen zu verschiedenen Zeiten Bakterien. Diese wurden vom Medium abgetrennt und gewaschen. Bei der Bestimmung ihrer Glykolyse, ihrer Atmung und ihres K-Transportes zeigte sich, daß die verringerte aerobe und anaerobe Glykolyse (Abb. 6), die verringerte Atmung (Abb. 7) und der erniedrigte K-Transport (Abb. 8) der Mg-armen Zellen wieder auf den Wert der Mg-reich gewachsenen Zellen ansteigen. Gleichzeitig stellt sich auch wieder die normale Größe des Pasteur-Effektes ein (Abb. 9), und die Glykolyse und Atmung der Zellen wird durch 2,4 DNP und Azid wieder in typischer Weise beeinflußt. Die Wachstumskurve für diese Versuche enthält Abb. 10.

Für die Normalisierung dieser Stoffwechselleistungen ist Wachstum und Proteinsynthese erforderlich. Inkubiert man Zellen in einem Mg-reichen aber aminosäurefreien Medium ohne Stickstoffquelle, so daß die Zellen nicht wachsen können, so werden diese Stoffwechselleistungen nicht behoben (Abb. 7, 8, 9, 10), obwohl die Zellen schon innerhalb weniger Minuten mit gleicher Geschwindigkeit den gleichen Mg-Gehalt erreicht haben wie wachsende Zellen (Abb. 1).

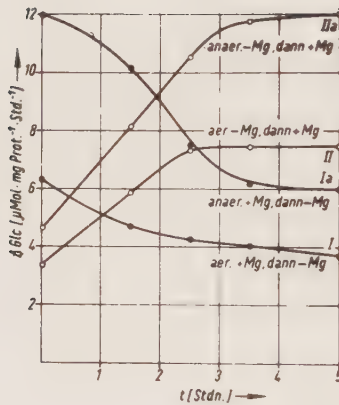


Abb. 6:

Abnahme der aeroben (I) und anaeroben Glykolyse (Ia) Mg-reich gewachsener *E. coli*-Zellen nach Wachstum in Mg-freiem Medium sowie Zunahme der aeroben (II) und anaeroben Glykolyse (IIa) Mg-arm gewachsener *E. coli*-Zellen nach Wachstum in Mg-haltigem ($3 \cdot 10^{-3} \text{M}$ Mg) Medium. Zu den angegebenen Zeiten wurden aliquote Teile der Zellsuspensionen entnommen. Die Zellen wurden bei 6000 g abzentrifugiert, einmal mit bidest. Wasser gewaschen und bei 37°C in 2 ml 0,15M Tris-puffer, pH 7,2, der 0,045M KCl und 0,06M Natriumphosphat enthielt, 60 Min. inkubiert. Anaerobe Bedingungen wurden durch 10^{-3}M KCN eingestellt. Die Ansätze enthielten ca. 0,5 mg Protein. Der Glukoseverbrauch wurde mit Glukoseoxydase und Peroxydase ermittelt.

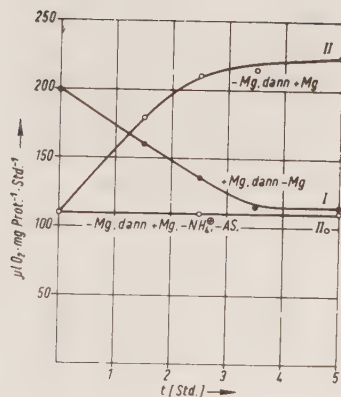


Abb. 7:

Abnahme der Atmung Mg-reich gewachsener *E. coli*-Zellen nach Züchtung in Mg-freiem Medium (I) und Atmung Mg-arm gewachsener nach Wachstum in Mg-haltigem ($3 \cdot 10^{-3} \text{M Mg}$) Wachstumsmedium (II) sowie nach Inkubation in Mg-haltigem, aber NH_4 - und Aminosäure-freiem Medium (II_0), also bei verhindertem Zellwachstum. Zu den angegebenen Zeiten wurden aliquote Teile der Zellsuspensionen entnommen und wie unter Abb. 6 beschrieben, behandelt und inkubiert. Die Atmung wurde manometrisch mit 0,2 ml 20% KOH im Einsatz ermittelt.

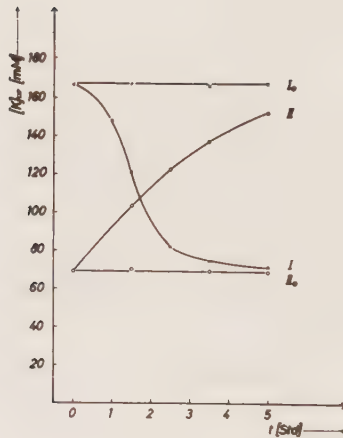


Abb. 8:

Kurve I: Intracellulärer K-Gehalt Mg-reicher Zellen während des Wachstums in Mg-freiem Medium.

Kurve II: Intracellulärer K-Gehalt Mg-armer Zellen während des Wachstums in einem Medium mit 10^{-2} M Mg.

Kurve II₀: Inkubation Mg-arm gewachsener Zellen in einem Mg-reichen Medium ohne Stickstoffquelle, so daß kein Zellwachstum eingetreten ist.

Kurve I₀: Inkubation Mg-reicher Zellen in Mg-reichem Medium.

x = Mg-reich gewachsene Zellen

o = Mg-arm gewachsene Zellen

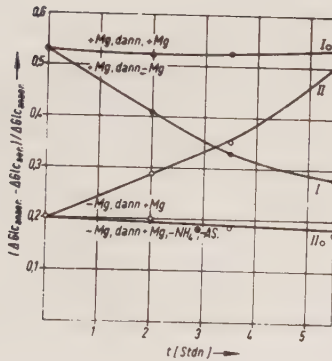


Abb. 9:

Pasteur-Effekt Mg-arm und Mg-reich gewachsener *E. coli*-Zellen bei verschiedenen Wachstumsbedingungen; Versuchsbedingungen wie unter Abb. 6 beschrieben.

$Glc_{anaer.}$ = anaerober Glukoseverbrauch;

$Glc_{aer.}$ = aerober Glukoseverbrauch.

I₀: Mg-reich gewachsene Zellen nach Wachstum in Mg-haltigem ($3 \cdot 10^{-3} M$ Mg) Medium;

I: Mg-reich gewachsene Zellen nach Wachstum in Mg-freiem Medium;

II: Mg-arm gewachsene Zellen nach Wachstum in Mg-haltigem ($3 \cdot 10^{-3} M$ Mg) Medium;

II₀: Mg-arm gewachsene Zellen nach Inkubation in Mg-haltigem, aber NH_4 - und aminosäurefreiem Medium ohne Zellwachstum.

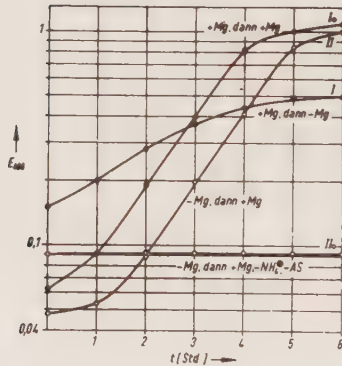


Abb. 10:

Vermehrung Mg-arm und Mg-reich gewachsener *E. coli*-Zellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen. In stündlichen Abständen wurde im Photometer Eppendorf die Extinktion bei 405 nm gemessen.

- I: Wachstum von Mg-reich gewachsenen Zellen in Mg-freiem Medium;
- I_0 : Wachstum von Mg-reich gewachsenen Zellen in Mg-haltigem ($3 \cdot 10^{-3} M$ Mg) Medium;
- II: Wachstum von Mg-arm gewachsenen Zellen in Mg-haltigem ($3 \cdot 10^{-3} M$ Mg) Medium;
- II_0 : Wachstum von Mg-arm gewachsenen Zellen in Mg-haltigem Medium, das jedoch frei von NH_4 - und Aminosäuren war.

Diskussion

Die Änderungen von Glc-6-P und Fru-1,6-P₂ sprechen für eine Erhöhung der Phosphofruktokinase-Aktivität in intakten Mg-armen Zellen. Damit übereinstimmend ergab die direkte Bestimmung dieses Enzyms, daß sein Gehalt bei Mg-armen Zellen fast verdoppelt ist (Tab. 4). Da Phosphofruktokinase als allosterisches Enzym durch zahlreiche Effektoren (ATP, ADP, Fru-6-P, P-Enolpyruvat, Citrat, PO₄³⁻) komplex beeinflusst wird (16, 17), kann die vermehrte Phosphofruktokinase noch zusätzlich aktiviert sein. Sie könnte durch das verringerte P-Enolpyruvat enthemmt und durch die erhöhte PO₄-Konzentration wie bei tierischen Zellen (18) stimuliert sein. Eine Enthemmung durch die verringerte Citrat-Konzentration, die bei der Hefe-Phosphofruktokinase auch bei Mg-Überschuß erfolgt (19), ist ungewiß, da die Citrathemmung des E. coli-Enzyms in vitro nur bei niedrigen Mg-Konzentrationen stattfindet (17).

Die Abnahme des P-Enolpyruvats und Zunahme der Pyruvat-Konzentration zeigen eine erhöhte Pyruvatkinase-Aktivität an, die sich durch direkte Bestimmung der Pyruvatkinase bestätigen läßt (Tab. 4). Darüber hinaus ist es möglich, daß die erhöhte Fru-1,6-P₂-Konzentration in einer positiven "feed-forward"-Reaktion die Aktivität der Pyruvatkinase in der intakten Zelle zusätzlich erhöht, wie in Versuchen an isolierter Hefe-Pyruvatkinase nachgewiesen wurde (20). Die Erhöhung der Pyruvatkonzentration, die zu der vermehrten Laktat-Bildung beiträgt, kann auch durch einen geringeren Abbau infolge der stark erniedrigten Pyruvat-Decarboxylase-Aktivität hervorgerufen werden, die gleichzeitig zu einer verminderten Citratbildung und Citratkonzentration führen kann.

Da die umsatzbestimmenden Reaktionen, die von der Phosphofruktokinase, 3-Phospho-glycerat-Kinase und Pyruvatkinase katalysiert werden (21), bei Mg-arm gewachsenen Zellen, wie sich an Hand der Zwischenstoffkonzentrationen ergibt, nicht verlangsamt sind, muß für den geringeren Glucoseverbrauch Mg-arm gewachsener Zellen die Verlangsamung einer vor dem Angriffspunkt der Phosphofruktokinase liegenden Reaktion ver-

antwortlich sein. Hierfür kämen die Hexokinase und die Glukosepermease, die bei *E. coli* für die Aufnahme von Glukose (und Glukosiden) verantwortlich ist, in Frage (13).

Durch direkte Bestimmung fanden wir, daß die Hexokinase-Aktivität Mg-armer Zellen verdoppelt ist (Tsb. 4). Das Verhalten der ATP-, Glc-6-P- und PO_4^{3-} -Konzentration erlaubt keinen Rückschluß auf eine verminderte Hexokinase-Aktivität. Diese könnte aber durch eine niedrigere intrazelluläre Glukose- oder Mg-Ionen-Konzentration zustande kommen. Eine Limitation durch eine niedrigere Mg-Ionen-Konzentration ist unwahrscheinlich, sie hätte auch bei anderen umsatzbestimmenden Mg-abhängigen Reaktionen (stimuliert durch Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase), die die gleiche pMg-Abhängigkeit aufweisen (Abb. 3b), eintreten müssen. Eine niedrigere intrazelluläre Glukosekonzentration erscheint dagegen möglich, weil Mg-arme Zellen eine niedrigere Glukosepermease-Aktivität haben. Da die Glukoseaufnahme durch Glukosepermease über eine Phosphorylierung unter Bildung der 6-Phosphate verläuft (22), wäre die Hexokinase unter diesen Umständen für den Glukoseabbau in *E. coli* nicht nötig.

Der geringere Glukoseabbau Mg-armer Zellen wäre somit auf die geringere Glukosepermease-Aktivität zurückzuführen. Die Aktivität der Glukosepermease müßte dann gleich dem Glukoseverbrauch sein. Berechnet man aus den Werten von Abb. 2 und der spezifischen Aktivität die Aufnahme von α -Methylglukosid in die *Coli*-Zellen, so ergibt sich eine Aufnahme von $3 \cdot 10^{-9}$ Mol/mg Prot. · Min. Der Glukoseverbrauch beträgt aber 10^{-7} Mol/mg Prot. Min.. Für die geringere α -Methylglukosidaufnahme könnten 2 Faktoren verantwortlich sein.

1.) Die Glukosepermease hat mit α -Methylglukosid eine geringere Aktivität als mit Glukose. Bei Versuchen mit *S. aureus* wurde $^{14}\text{C}_1$ -Glukose tatsächlich etwa 10 x schneller als ^{14}C - α -Methylglukosid in die Zellen aufgenommen (23). Das Ergebnis ist aber ungenau, da ^{14}C -Glukose in der Zelle sofort abgebaut wird und die eingebaute ^{14}C -Menge sowie die als $^{14}\text{CO}_2$ abgegebene ^{14}C -Menge berücksichtigt werden muß.

2.) Ein Teil des intrazellulär aufgenommenen α -Methylglukosid wird beim Waschen zur Entfernung des extrazellulären Methylglukosid ausgewaschen bzw. während des Waschens nach außen transportiert (13).

Entscheidend ist, daß die berechnete Aufnahme des α -Methylglukosids gleich oder kleiner im Vergleich zum Glukoseverbrauch ist; denn nur dann ist es berechtigt, die Glukosepermease für die Limitation des Durchsatzes durch die Glykolyse verantwortlich zu machen.

In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die Glukosepermease auch am Zustandekommen des Pasteur-Effektes von Hefezellen beteiligt sein soll (24).

Die verringerte aerobe Glykolyse und Atmung Mg-armer Zellen lassen sich durch Entkoppler nur noch geringfügig steigern. Daraus kann man schließen, daß bei Mg-armen Zellen eine partielle Entkopplung vorliegt. Für die Kopplung von Atmung und Phosphorylierung sind Kopplungsfaktoren nötig. Ihre Bindung erfolgt unter anderem durch Mg-Ionen (25). Wären diese Kopplungsfaktoren in den Mg-verarmten Zellen noch vorhanden und durch den Mg-Mangel nur von ihren Strukturen abdissoziiert, so hätte der Pasteur-Effekt auch ohne Wachstum in den Mg-verarmten Zellen nach Inkubation in Mg-haltigem Medium wieder in voller Stärke eintreten müssen. Anscheinend werden, wenn es beim Wachsen in einem Mg-armen bzw. Mg-freien Medium in der Zelle zu einer Abnahme der Mg-Konzentration kommt, ein oder mehrere Kopplungsfaktoren der oxydativen Phosphorylierung nicht mehr in ausreichender Menge gebildet.

Mit der partiellen Entkopplung läßt sich auch die Hemmung des aktiven K-Transportes erklären. Mg-arm gewachsene Zellen weisen immer nur eine geringfügig höhere intrazelluläre K-Konzentration als die extrazelluläre K-Konzentration auf, während die Kontrollzellen intrazellulär eine um ca. 100 mM höhere K-konzentration als extrazellulär besitzen.

Wegen der Energieabhängigkeit des K-Transportes verglichen wir die intrazelluläre ATP-, ADP- und AMP-Konzentrationen. Da Mg-arm gezüchtete Zellen nur minimale Unterschiede in ihrem Nukleotidgehalt zeigen, kann der verringerte K-Transport bei

Mg-armen Zellen also nicht auf einer erniedrigten ATP-Konzentration beruhen.

Da Mg-arm und Mg-reich gewachsene Zellen die gleiche ATPase-Aktivität haben, kann die ATPase nicht für die starke Hemmung des K-Transportes verantwortlich sein. Hinzu kommt, daß es unklar ist, ob die Membran-ATPase von *E. coli* überhaupt am K-Transport bei diesen Bakterien beteiligt ist (26).

Da der K-Transport in *E. coli* praktisch nur durch Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung (mit 2,4 DNP) (Tab. 9) (15) gehemmt wird, kann man annehmen, daß bei Mg-arm gewachsenen Bakterien die vorhandene Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung für den verringerten K-Transport verantwortlich ist. *E. coli* hat als fakultativer Anaerobier unter anaeroben Bedingungen die gleiche hohe intrazelluläre K-Konzentration wie aerob. Die ATP-Konzentrationen sind aber unter anaeroben Bedingungen bei Mg-reich und Mg-arm gewachsenen Zellen niedriger als aerob (Tab. 10). Es besteht also beim Vergleich von anaeroben mit aeroben Bedingungen sowie Mg-arm und Mg-reich gezüchteten Zellen keine Korrelation zwischen ATP-Gehalt und der intrazellulären K-Konzentration, so daß die Energie für den K-Transport wahrscheinlich nicht direkt vom ATP sondern von einem Zwischenprodukt der oxydativen Phosphorylierung stammen könnte (27).

Die intrazelluläre K-Konzentration bei verschiedenen DNP-Konzentrationen zeigt unter aeroben und anaeroben Bedingungen die gleiche Abhängigkeit von der DNP-Konzentration (Abb. 5) Dies spricht dafür, daß 2,4 DNP unter aeroben und anaeroben Bedingungen in gleicher Weise den K-Transport von *E. coli* hemmt und daß das glykolytisch gebildete ATP den K-Konzentrationsgradienten nicht aufrechterhalten kann.

Bricker et al. (27) haben angenommen, daß unter anaeroben Bedingungen bei der Glykolyse entstandenes ATP rückläufig ein Zwischenprodukt der oxydativen Phosphorylierung bildet, das die Energie für den aktiven K-Transport liefern soll. Dieses Zwischenprodukt soll durch DNP hydrolysiert werden.

Eine derartige Wirkung kann eine Aktivierung der ATPase dar-

stellen, die sich an Mitochondrien durch DNP auch zeigen läßt (28, 29, 30). Die ATPase von *E. coli* wird jedoch durch 2,4 DNP nicht aktiviert (31). Das muß kein Widerspruch sein. Eine Aktivierung der ATPase würde z.B. ausbleiben, wenn eine der Reaktionen, die bei *E. coli* die rückläufige Bildung des am K-Transport beteiligten Zwischenproduktes der oxydativen Phosphorylierung bewirkt, die Gesamtreaktion limitiert.

Sekundäre Einflüsse des verminderten K-Transportes auf den Glukose- und O_2 -Verbrauch, die z.B. bei K-arm gewachsenen *E. coli*-K₁₂-Zellen auftraten und nach Reinkubation in K- und PO_4 -haltigen Medien innerhalb weniger Sekunden wieder verschwinden (32), sind auszuschließen, da die Zellen immer in einem Medium von K^+ (45 mM) und PO_4^{3-} (60 mM) inkubiert wurden. Die intrazelluläre K-Konzentration war mit etwa 70 mM so hoch, daß K-abhängige enzymatische Reaktionen (z.B. die durch Pyruvatkinase stimulierte (33), Acetataktivierung (34), oxydative Phosphorylierung (35) oder Enzymsynthese (36)) nicht durch eine niedrige intrazelluläre K-Konzentration limitiert wurden. Die hohe extrazelluläre PO_4^{3-} -Konzentration hatte im Gegensatz zur Untersuchung von Holzer et al. (37) keinen wesentlichen Einfluß auf die untersuchten Stoffwechselfunktionen und den Pasteur-Effekt (unveröffentlichte Versuche).

Die bei Mg-Mangel aufgetretenen Stoffwechseländerungen lassen sich durch eine Änderung im Enzymgehalt erklären.

Die Beeinflussung der Enzymaktivität unter Mg-Mangel-Bedingungen ist unterschiedlich.

Die Glukosepermease-Aktivität sinkt unter Mg-Mangel auf etwa die Hälfte der Aktivität der Kontrollzellen ab. Die Hexokinase-, Phosphofruktokinase-, Enolase-, Pyruvatkinase-Aktivität war bei den Mg-arm gewachsenen Zellen ca. doppelt so hoch wie bei den Mg-reich gewachsenen Zellen. Die Aldolase-, Laktat-Dehydrogenase- und Glc-6-P-Dehydrogenase-Aktivität war dagegen bei beiden Zelltypen etwa gleich groß. Bei der Isozitat-Dehydrogenase wiesen die Mg-reich gewachsenen Zellen eine ungefähr doppelt so hohe Aktivität auf wie die Mg-arm gewachsenen Zellen. Bei der NAD^+ -abhängigen Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Dekarboxylase war die Aktivität schließlich stark verringert (Tab. 4).

Eine Gesetzmäßigkeit, warum die Aktivität einiger Enzyme bei Mg-arm gewachsenen Zellen erhöht, anderer verringert und bei Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Dekarboxylase stark erniedrigt ist, läßt sich nicht erkennen. Es ist möglich, daß die Zunahme einiger Enzyme bei den Mg-arm gewachsenen Zellen nur vorgetäuscht ist, weil die Synthese anderer Proteine noch stärker gehemmt wird. Daraus würde sich ergeben, daß bei Mg-Mangel die Enzymsynthese einiger Enzyme früher, wenn der intrazelluläre Mg-Gehalt noch höher ist, zum Stillstand kommt. Eine Aktivitätsänderung der an der Protein- und Nukleinsäurebildung beteiligten Enzyme infolge Abnahme der intrazellulären Mg-Konzentration ist auszuschließen, weil hierdurch die Synthese aller Enzyme im gleichen Maße betroffen sein müßte.

Am Zustandekommen dieser unterschiedlichen Enzymsynthese könnte die "Katabolit-Repression" (38) beteiligt sein. Bei der "Katabolit-Repression" aktiviert in der Regel ein Endprodukt einer katabolen Reaktionskette den vom Regulatorgen gebildeten Aporepressor. Dieser aktive Repressor blockiert das Operatorgen, so daß an den Strukturgenen des entsprechenden Operon keine m-RNS synthetisiert wird. Die Folge ist, daß die entsprechenden Enzyme nicht mehr gebildet werden.

Nach dem gleichen Reaktionsschema könnte auch die Änderung einer Zwischenstoffkonzentration die Enzymsynthese verändern. Bei Mg-arm gewachsenen Zellen kämen hierfür als Zwischenstoffkonzentrationen mit großer Änderung besonders Glc-6-P, Fru-1,6-P₂, Pyruvat und Citrat in Frage (Tab. 5a).

Eine andere Möglichkeit, eine verringerte Enzymsynthese zu erklären, ist die Änderung der Codierung bei Mg-arm gewachsenen Zellen. Bei Versuchen am isolierten Proteinsynthese-System wurden bei einer Änderung der Mg-Konzentration im Ansatz vom gleichen messenger einige Aminosäuren in höherer andere in niedrigerer Rate in Protein eingebaut (7, 39, 40).

Die beobachteten Stoffwechselveränderungen bei Mg-arm gewachsenen Zellen wären danach die Folge eines veränderten Enzymbestandes. Hiermit stimmt überein, daß bei Mg-Mangel

die Proteinsynthese zuerst beeinträchtigt wird, denn bei in vitro-Versuchen werden markierte Aminosäuren bei ca. 10 mM $[Mg^{2+}]$ mit maximaler Geschwindigkeit in Protein eingebaut, bei 1 mM $[Mg^{2+}]$ jedoch nur noch mit ca. 7 % der maximalen Rate (41). Die Mg-abhängigen Enzyme Hexokinase, Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase aus *E. coli* sind aber bei diesem pMg von 3 noch maximal aktiviert (Abb. 3a - 3c). Einen analogen Schluß zogen Marchesi et al. (42) aus Versuchen über den Einbau markierter Aminosäuren in Mg-verarmte Zellen von *Aerobacter aerogenes*.

Bei Mg-Verarmung der Zelle wird also die Proteinbiosynthese in der Zelle zuerst beeinträchtigt, während sich die Veränderungen anderer Stoffwechselleistungen (Atmung, Glykolyse, K-Transport) erst sekundär durch einen veränderten Gehalt an Enzymen (und Kopplungsfaktoren) einstellen. Wenn aber Stoffwechseleränderungen bei Mg-Mangel erst nach einer Veränderung im Enzymproteinbestand auftreten, dann muß die Mg-Konzentration in der Zelle einen Wert haben, bei dem die Mg-benötigenden Enzyme mit Mg gesättigt sind. Dann kann aber Mg an der Regulation von Atmung und Glykolyse wie schon früher aus Untersuchungen an tierischen Zellen geschlossen (43) nicht beteiligt sein.

Diese an *E. coli* gewonnenen Ergebnisse lassen sich - soweit bisher untersucht - auf tierische Organismen übertragen. Leber-Ribosomen benötigen für die Proteinsynthese die gleich hohe Mg-Konzentration wie *E. coli*-Ribosomen. Die Mg-abhängigen Enzyme aus tierischen Organen sind bei einem pMg von 3 noch ebenfalls optimal aktiviert. Bei 1 mM Mg im Ansatz ist der Aminosäureeinbau in Leberribosomen wie bei *Coli*-Ribosomen stark vermindert (44).

Der bei *E. coli* gefundenen Abnahme des K-Transportes und der partiellen Entkopplung könnte eine Abnahme des K-Gehaltes in einigen Organen von Ratten (Übersicht Walser (11) et (45)) und eine Abnahme des P/O-Quotienten isolierter Herzmuskel-mitochondrien entsprechen (2). In den Tierversuchen aufgetretene Streuungen der Versuchsergebnisse beruhen wahrscheinlich darauf, daß sich an Tieren weniger starke Mg-Mangelbedingungen erzeugen lassen als bei Bakterien.

Material und Methoden

Wir benutzten für die Versuche *E. coli* B 163. Dieser Stamm benötigt L-Leucin, L-Methionin und L-Histidin zum Wachsen. Die Bakterien wurden steril auf Schrägagarröhrchen verimpft und für die einzelnen Versuche bei 4°C aufbewahrt.

Zusammensetzung und Herstellung des Nährbodens

Agar	15 g	Wir ließen den Agar in
K ₂ HPO ₄	7 g	1000 ml aqua bidest 2
KH ₂ PO ₄	3 g	Stunden quellen. Nach
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g	Zugabe der Substanzen
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g	wurde solange im Wasser-
Glucose	2 g	bad gekocht, bis der
Na ₃ -Citrat	0,5 g	Agar keine Trübung mehr
Casein-		zeigte. Anschließend
hydrolysat	1 g	wurde der Nährboden 30
Hefeextrakt	1 g	Min. bei 120° C im Auto-
L-Leucin	100 mg	klaven sterilisiert.
L-Methionin	100 mg	
L-Histidin	100 mg	

Züchtung Mg-reich und Mg-arm wachsender Bakterien

Die Bakterien wurden zur Züchtung mit Nährmedium vom Schrägagar abgeschwemmt und in Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37° C unter Begasung durch Glasfritten mit 95 Vol % O₂ - 5 Vol % CO₂ gezüchtet.

Zusammensetzung des Nährmediums

NaCl	80 mM
KCl	30 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10 mM
NH_4Cl	15 mM
K_2HPO_4	30 mM
KH_2PO_4	30 mM
Glukose oder Glycerin (s. Tab. 4, 6b)	0,5 %
l-Leucin	100 mg/l
l-Histidin	100 mg/l
l-Methionin	100 mg/l

Bei der Züchtung Mg-reicher Bakterien betrug die MgCl_2 -Konz. 3 mM (wenn nicht anders angegeben);
bei der Züchtung Mg-armer Zellen $3 \cdot 10^{-7} \text{M}$.

Bestimmung des Mg-Gehaltes in den Zellen

4 ml einer ca. 2 g% Bakteriensuspension wird 10 Min. bei 4300 g zentrifugiert und 1 x mit bidest. Wasser zur Entfernung des extrazellulären Mg gewaschen. Das Bakterien-sediment wird mit 0,5 ml 100 % TCE (Trichloressigsäure) aufgelöst. Nach Zugabe von 5 ml H_2O bidest. wird das ausgefallene Protein 10 Min. bei 4300 g abzentrifugiert. Im klaren Überstand wird das Mg^{2+} , das das intrazelluläre Mg darstellt, nach Orange und Rhein (46) bestimmt.

Glukoseverbrauch und Atmung

Die über Nacht gewachsenen Zellen wurden einmal in bidest. Wasser gewaschen und in folgendem Medium bei 37°C inkubiert (Endkonzentration): 0,15M Trispuffer pH 7,2, 0,045M KCl, Na-Phosphat 0,06M pH 7,2, Glukose 100 mg%. Das Volumen der Ansätze betrug bei diesen Versuchen 2 ml. Die Reaktion wurde dadurch gestoppt, daß 1 ml des Inkubationsansatzes mit 1 ml 6 % HClO_4 versetzt wurde. Der Glukoseverbrauch wurde enzymatisch mit Hilfe von Glukoseoxydase und Peroxydase (Testkombination Fa. Boehringer) ermittelt. Anserobe Bedingungen wurden entweder durch Einleiten eines

95 Vol % N_2 und 5 Vol% CO_2 -Gasgemisches durch die Warburggefäße oder durch $10^{-3}M$ KCN im Ansatz hergestellt. Die Atmung wurde manometrisch nach der Eingefäßmethode mit 0,2 ml 20 % KCN im Einsatz gemessen.

Bestimmung der Enzymaktivität

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden die Zellen zweimal mit bidest. Wasser gewaschen, in 12 ml 0,025M Trispuffer pH 7,2 suspendiert und unter Kühlung in einer Eis-Kochsalzmischung mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Zellhomogenate wurden 35 Min. bei $0^\circ C$ und 120 000 g zentrifugiert. Verschiedene Mengen (0,5 - 1,0 mg Protein / 2 ml Ansatz) wurden zur Bestimmung verwendet.

Die Testensätze enthielten in 2 ml:

Hexokinase [μMol]: 120 Tris (pH 7,4), 4 Glucose, 1,6 $MgCl_2$, 1 $NADP-Na-H_2$, 1 $ATP-Na_2-H_2$, 50 μg Glucose-6-P-Dehydrogenase, Enzymüberstand, Start mit ATP.

Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase [μMol]: 200 Tris (pH 7,4), 14 Glucose-6-phosphat, 0,25 $NADP-Na-H_2$, 9,6 $MgCl_2$, Enzymüberstand, Start mit Glucose-6-phosphat.

Laktat-Dehydrogenase [μMol]: 200 Tris (pH 7,4), 20 KCN, 0,20 $NADH-Na_2$, 8,5 Na-Pyruvat, Enzymüberstand, Start mit Pyruvat.

Isozitrat-Dehydrogenase [μMol]: 200 Tris (pH 7,4), 1,6 $MgCl_2$, 0,2 $NADP-Na-H_2$, 3,0 D-L-Isozitrat- Na_3 , Enzymüberstand, Start mit Isocitrat.

Alkohol-Dehydrogenase [μMol]: 120 Pyrophosphat (pH 8,7), 120 Semicarbacid, 1,3 mMol Äthanol, 2,4 NAD, 20 KCN, Enzymüberstand, Start mit Äthanol.

NAD-abhängige Glycerophosphat-Dehydrogenase [μMol]: 200 Tris (pH 7,4), 0,26 $NADH-Na_2$, 3,6 Triosephosphatester (mit $NaHCO_3$ neutralisiert), Enzymüberstand, Start mit Triosephosphat.

Phosphofructokinase: Der Inkubationsansatz enthielt in 1,3 ml [μMol]: 78 Tris (pH 8,0), 2,0 $MgCl_2$, 2,0 ATP, 10 Fruc-

tose-6-phosphat, Enzymüberstand (ca. 100 μg Protein), Start mit Fructose-6-phosphat. Nach 15 Min. Inkubation bei 25°C wird der Ansatz mit 0,2 ml 30 % HClO_4 enteiweißt. Nach Zentrifugation wird der Überstand mit festem KHCO_3 neutralisiert und in den folgenden optischen Test eingesetzt: 200 μMol Tris (pH 7,4), 0,26 μMol NADH-Na_2 , 20 μg Aldolase, Start mit Glycerophosphat-Dehydrogenase, Volumen 2 ml.

Aldolase: Der Inkubationsansatz enthielt in 1,3 ml [μMol]: 130 Tris (pH 7,4), 9,1 Fructosediphosphat und Enzymüberstand (ca. 100 μg Protein). Dieser Ansatz wird 15 Min. bei 25°C inkubiert, mit 0,2 ml 30 % HClO_4 enteiweißt und mit festem KHCO_3 neutralisiert. Der neutralisierte Überstand wird mit 200 μMol Tris (pH 7,4), 0,26 μMol NADH-Na_2 und 20 μg Glycerophosphat-Dehydrogenase (GDH) in einem Volumen von 2 ml getestet. Start mit GDH.

Enolase: Der Inkubationsansatz enthielt in 1,3 ml [μMol]: 130 Tris (pH 7,4), 1,95 MgCl_2 , 9,9 2-Phosphoglycerat und Enzymüberstand. 15 Min. Inkubation bei 25°C. Der mit HClO_4 enteiweißte und mit KHCO_3 neutralisierte Überstand wird getestet mit: 200 μMol Tris (pH 7,4), 2 μMol ADP, 2 μMol MgCl_2 , 0,26 μMol NADH , 20 μg LDH (Boehringer), 20 μg Pyruvatkinase (Boehringer). Start mit Pyruvatkinase, Volumen 2 ml.

Pyruvatkinase: Der Inkubationsansatz enthielt in 1,3 ml [μMol]: 78 Tris (pH 7,4), 1,95 MgCl_2 , 1,95 ADP-Na_3 , 4,7 Phosphoenolpyruvat, Enzymüberstand. 15 Min. Inkubation bei 25°C. Der enteiweißte und neutralisierte Überstand wird in 2 ml mit 200 μMol Tris (pH 7,4), 0,26 μMol NADH-Na_2 und 20 μg LDH (Boehringer) getestet.

Die Extinktionsänderung der Nukleotide NADH und NADPH wurde im Photometer Eppendorf gemessen. Die Enzymaktivität $\text{m}\mu\text{Mol/mg Prot.}\cdot\text{Min.}$ wurde mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes

$$\Delta E = \varepsilon_{366} \cdot d \cdot \Delta c \text{ berechnet.}$$

Die Aktivität der Pyruvat-Dekarboxylase wurde bei 37°C manometrisch bestimmt. Dazu wurden die Zellen in 0,15M KCl mit Ultraschall homogenisiert. Der Ansatz enthielt 1 ml Homogenet, 1 ml 0,1M Phosphatpuffer pH 6,0, 0,2 ml 1,2M Pyruvat und 0,2 ml $6 \cdot 10^{-3}$ M Thiaminpyrophosphat-Lösung mit festem Tris auf pH 6,0 eingestellt. Die Enzymaktivität wurde aus der CO_2 -Bildung ($\mu\text{l CO}_2/\text{mg Prot.} \cdot \text{Min.}$ unter Berücksichtigung des Molvolumens errechnet.

Glukose-Permease

Die Aktivität der Glukosepermease wurde durch die Aufnahme von ^{14}C -Methylglucopyranosid gemessen. Hierzu wurden die Bakterien in 0,15M Trispuffer pH 7,2, der 0,045M an KCl und 0,06M an Na-Phosphat enthielt, 10 Min. bei 37°C mit 100 mg% Glycerin vorinkubiert. 5 Min. nach Zugabe von ^{14}C - α -Methylglucopyranosid werden 3 ml der Zellsuspension durch Milliporefilter (HAWP 02500, HA 0,45 μ) gesaugt. Die Filter wurden zweimal mit 2 ml kaltem glukosid- und glycerinfreien Medium gewaschen und mit 6 ml Szintillationsgemisch (2 g POP (2,5 Diphenyloxazol), 25 mg Dimethyl-POPOP (1,4-Bis-[4-methyl-5-phenyl-oxazolyl-(2)]-benzol und 60 g Naphthalin in 0,5 l Dioxan) im Tricarb mit internem Standard gemessen.

pMg-Abhängigkeit der Hexokinase-, der Isocitrat-Dehydrogenase- und Phosphofruktokinase-Aktivität

a) Bestimmung der Hexokinase-Aktivität als Funktion des pMg

Die Zusammensetzung des Testansatzes ist oben angeführt. Die Gesamt-Mg-Konzentration beträgt zwischen 0,136 und 39,33 mM, insgesamt 7 verschiedene Konzentrationen.

Alle Substanzen werden in 0,15M KCl ($\mu = 0,15\text{M}$) gelöst.

0,15M Trispuffer der Ionenstärke 0,15M wurde wie folgt hergestellt: 10 ml einer 1,5M Lösung von Tris (Trishydroxymethylaminomethan) in 0,15M KCl werden mit 0,15 n HCl bis zu dem gewünschten pH titriert und mit 0,15M KCl auf 100 ml aufgefüllt.

Die Mg-Ionenkonzentration bzw. die pMg-Werte wurden nach folgender Gleichung berechnet (1).

$$[Mg^{2+}] = -\frac{1}{2} \left([X]_{ges.} - [Mg]_{ges.} + \frac{1}{K} \right) \pm \sqrt{\frac{([X]_{ges.} - [Mg]_{ges.} + \frac{1}{K})^2}{4} + \frac{[Mg]_{ges.}}{K}}$$

$[Mg^{2+}]$ Mg-Ionenkonzentration

$[X]_{ges.}$ Mg-Komplexbildner hier ATP

$[K]$ Komplexbildungskonstante bei $\mu = 0,15M$

$[Mg]_{ges.}$ Gesamt-Mg-Konzentration

b) Bestimmung der Isoziträt-Dehydrogenase-Aktivität als Funktion des pMg

Die Zusammensetzung des Testansatzes ist oben angegeben. Die Gesamt-Mg-Konzentration beträgt zwischen 0,129 und 33,42 mM, insgesamt 7 verschiedene Konzentrationen.

Alle Substanzen wurden in 0,15M KCl gelöst.

Isocitrat stellt bei dieser Reaktion den Komplexbildner dar; die Mg-Ionenkonzentration wurde wie unter a) berechnet.

c) Bestimmung der Phosphofruktokinase-Aktivität als Funktion des pMg

Der Testansatz und das Verfahren zur PFK-Aktivitätsbestimmung ist oben aufgeführt. Die Gesamt-Mg-Ionenkonzentrationen schwanken zwischen 0,188 mM und 27,86 mM.

Alle Substanzen wurden in 0,15M KCl gelöst, der Komplexbildner ist ATP. Die Berechnung der Mg-Ionenkonzentration erfolgt wie unter a) angegeben

Zwischenstoffkonzentrationen

Zur Bestimmung der Zwischenstoffkonzentrationen wurden die Ansätze im gleichen Medium wie bei der Bestimmung des Glukoseverbrauchs (0,15M Trispuffer pH 7,2, 0,045M KCl, Na-Phosphat 0,06M, Glukose 100 mg%) (Volumen 30 ml) 5 Min. bei

37°C in Metallzentrifugenbechern unter Begasung mit einem 95 Vol% O₂ - 5 Vol% CO₂-Gemisch inkubiert und danach unter Begasung durch Eintauchen in flüssige Luft auf 0°C gekühlt. Die Zellen wurden bei 0°C abzentrifugiert, mit 4 ml eiskalter 6% HClO₄ versetzt und zur Vervollständigung des Zellaufschlusses mit Ultraschall behandelt. Der Zellaufschluß wurde 30 Min. bei 120 000 g und 0°C zentrifugiert. Im Überstand, der mit festem KHCO₃ neutralisiert wurde, wurden folgende Bestimmungen im optischen Test durchgeführt.

Die Testansätze enthielten in 2 ml (Angaben in µMol)

Glc-6-P	200 Trispuffer pH 7,4, 10 MgCl ₂ , 1 NADP-Na-H ₂ , neutr. Überstand, Glc-6-P-DH 20 µg (Boehringer), Start mit Glc-6-P-DH
Fru-1,6-P ₂	200 Trispuffer pH 7,4, NADH-Na ₂ 0,26, neutr. Überstand, 20 µg GDH (Boehringer) 20 µg Aldolase (Boehringer), Start durch Aldolase
Dihydroxy-aceton-P	200 Trispuffer pH 7,4, 0,26 NADH-Na ₂ , neutr. Überstand, 20 µg GDH (Boehringer), Start durch GDH
Glycerinaldehyd-P	200 Trispuffer pH 7,4, NADH-Na ₂ , neutr. Überstand, 20 µg GDH (Boehringer), 20 µg TIM (Trioseisomerase) (Boehringer), Start mit TIM
2-P-Glycerat	200 Trispuffer pH 7,4, 0,26 NADH-Na ₂ , neutr. Überstand, 20 µg LDH (Boehringer), 2,2 MgCl ₂ , 2,2 ADP, 20 µg PK (Boehringer), ENOL 20 µg (Boehringer), Start mit ENOL
P-Enol-pyruvat	200 Trispuffer pH 7,4, 0,26 NADH-Na ₂ , neutr. Überstand, 20 µg LDH (Boehringer), 2,2 MgCl ₂ , 2,2 ADP, 20 µg PK (Boehringer), Start durch PK
Pyruvat	200 Trispuffer pH 7,4, 0,26 NADH-Na ₂ , neutr. Überstand, 20 µg LDH (Boehringer), Start mit LDH

Citrat im optischen Test nach Gruber und Moellerung (47)

PO₄ nach Fiske und Subbarow (48)

ATP (Testkombination Boehringer)

ADP/AMP (Testkombination Boehringer)

NAD, NADH, NADP, NADPH nach Holzer et al. (49)

Bestimmung der Endprodukte

Zur Bestimmung der Endprodukte des aeroben und anaeroben Glukoseabbaus wurden die Zellen (ca. 4 mg Protein) in 3 ml 0,15M Trispuffer pH 7,2, der 0,045M KCl, 0,06M Na-Phosphat und 1 g% Glukose enthielt, 90 Min. bei 37°C in Warburggefäßen inkubiert, danach sofort mit Eis-Kochsalzmischung auf 0°C gekühlt und 10 Min. bei 6000 g zentrifugiert. Im Überstand bestimmten wir:

Milchsäure nach Berker und Summersen (50)

Äthanol im optischen Test mit NAD und Alkohol-Dehydrogenase in Gegenwart von Semicarbazid

Ameisensäure nach Hopton (51)

Bestimmung von K, Na und Wassergehalt

Die über Nacht gezüchteten Zellen wurden einmal gewaschen und bei 37°C unter Begasung mit einem 95 Vol% O₂ und 5 Vol% CO₂-Gemisch in folgendem Inkubationsansatz inkubiert (30 ml), 0,15M Trispuffer pH 7,2, 0,045M KCl, 0,09M NaCl, 1 mM MgCl₂ und 0,5% Glukose oder Glycerin (s. Tab. 9). Der Ansatz enthielt in 30 ml ca. 200 mg Zellen (Feuchtgewicht). Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen durch 10minütiges Zentrifugieren bei 17 000 g abgetrennt und über Nacht im Vakuum-trockenschrank bei 1 Torr und 80°C getrocknet.

Der Wassergehalt wurde aus dem Gewichtsverlust bei der Trocknung ermittelt.

Zur Bestimmung des Na- und K-Gehaltes wurden ca. 6 mg Trockensubstanz in Durangläser eingewogen, 1 Stunde mit 0,2 ml konz. HNO₃ im siedenden Wasserbad erhitzt und nach Zugabe von 5 ml bidest. Wasser flammenphotometriert. In den Überständen wurde der pH-Wert und die Na- und K-konzentration kontrolliert. Die intrazellulären Na- und K-konzentrationen wurden nach Abzug des extrazellulären Elektrolytgehaltes unter Berücksichtigung des intrazellulären Wassergehaltes errechnet.

Zur Bestimmung der ATPase-Aktivität wurden die über Nacht gewachsenen Bakterien zweimal mit bidest. Wasser gewaschen und direkt verwendet oder in 5 ml 0,1M Trispuffer pH 7,2 suspendiert und mit Ultraschall unter Kühlung mit einer Eis-Kochsalzmischung aufgeschlossen. Das Homogenat wurde 30 Min. bei 0°C und 120 000 g zentrifugiert. Im Sediment und Überstand ermittelten wir ebenfalls die ATPase-Aktivität. Die ATPase-Aktivität wurde 2 Std. bei 37°C in folgendem Inkubationsansatz gemessen: 0,1M Trispuffer pH 7,5, Mg-ATP 5 mM, NaCl 20 mM, intakte Zellen oder 120 000 g-Sediment oder Überstand. Der Ansatz (1 ml) wurde mit 0,5 ml 15% Trichloressigsäure (TCE) enteiweißt. In je 0,5 ml des TCE-Extraktes wurde das abgespaltene anorganische PO_4 nach Fiske und Subbarow (48) bestimmt.

Wachstumsmedium unter verschiedenen Mangelbedingungen

Endkonzentrationen der verschiedenen Bestandteile der Medien:

K-arm	0,5% Glukose, 1-Leucin, 1-Histidin, 1-Methionin je 100 mg/l, 30 mM NaH_2PO_4 , 30 mM Na_2HPO_4 , 15 mM NH_4Cl , 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 80 mM NaCl
SO_4 -arm	0,5% Glukose, 1-Leucin, 1-Histidin, 1-Methionin je 100 mg/l, 80 mM NaCl, 30 mM KH_2PO_4 , 30 mM K_2HPO_4 , 30 mM KCl, 30 mM NH_4Cl
PO_4 -arm	0,5% Glukose, 1-Leucin, 1-Histidin, 1-Methionin je 100 mg/l, 80 mM NaCl, $10^{-6}M$ KH_2PO_4 , 90 mM KCl, 15 mM NH_4Cl , 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 100 mM Trispuffer pH 7,2
NH_4 -arm	0,5% Glukose, 1-Leucin, 1-Histidin, 1-Methionin je 10 mg/l, 80 mM NaCl, 30 mM KH_2PO_4 , 30 mM K_2HPO_4 , 15 mM Na_2SO_4 , 30 mM KCl

Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et al. (52)

Statistik

Die Werte in den Tabellen stellen Mittelwerte $\bar{x}$ dar, die sich aus

$$\bar{x} = \frac{x_i}{n} \quad \text{ergeben.}$$

Der mittlere Fehler des Mittelwertes f wurde nach folgender Formel

$$f = \pm \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{n(n-1)}} \quad \text{berechnet.}$$

$\bar{x}$ Mittelwert

x_i Einzelwerte

n Zahl der Versuche

f mittlerer Fehler des Mittelwertes

Erläuterung der Abkürzungen

DNS	= Desoxyribonucleinsäure
RNS	= Ribonucleinsäure
m-RNS	= messenger-Ribonucleinsäure
t-RNS	= Transfer-Ribonucleinsäure
ATP	= Adenosintriphosphat
ADP	= Adenosindiphosphat
AMP	= Adenosinmonophosphat
NAD	= Oxydierte Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	= Reduzierte Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP	= Oxydierte Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	= Reduzierte Form des Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
P	= PO_4^{3-} in Verbindungsnamen
Glc-6-P	= Glucose-6-phosphat
Fru-6-P	= Fructose-6-phosphat
Fru-1,6-P ₂	= Fructose-1,6-diphosphat
2,4 DNP	= Dinitrophenol
KCN	= Kaliumcyanid
TCE	= Trichloressigsäure
HClO ₄	= Perchlorsäure
EZF	= Extracelluläre Flüssigkeit
IZF	= Intracelluläre Flüssigkeit
S	= Sedimentationskonstante

Enzyme

Adenylat-Kinase, ATP:AMP-Phosphotransferase
(EC 2.7.4.3)

ADH = Alkohol-Dehydrogenase, Alkohol:NAD-Oxyreduktase
(EC 1.1.1.1)

Citrat-Lyase, Citrat-Oxalacetat-Lyase (EC 4.1.3.6)

ALD = Fructosediphosphat-Aldolase, Fructose-1,6-diphosphat-D-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Lyase (EC 4.1.2.13)

Glucoseoxydase, β -D-Glucose:Sauerstoff-Oxydoreduktase (EC 1.1.3.4)

Glc-6-P-DH = Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, D-Glucose-6-phosphat:NADP-Oxydoreduktase (EC 1.1.1.49)

Glutamat-Dehydrogenase (NADP), L-Glutamat:NADP-Oxydoreduktase (desaminierend) (EC 1.4.1.4)

Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase, D-Glycerinaldehyd-3-phosphat:NAD-Oxydoreduktase (phosphorylierend) (EC 1.2.1.12)

GDH = Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase, L-Glycerin-3-phosphat:NAD-Oxydoreduktase (EC 1.1.1.8)

HK = Hexokinase, ATP:D-Glucose-6-Phosphotransferase (EC 2.7.1.1)

ICDH = Isozitratdehydrogenase (NADP), L-Isozitrat:NADP-Oxydoreduktase (EC 1.1.1.42)

LDH = Lactat-Dehydrogenase, L-Lactat:NAD-Oxydoreduktase (EC 1.1.1.27)

Malat-Dehydrogenase, L-Malat:NAD-Oxydoreduktase (EC 1.1.1.37)

Peroxydase, Donator:Wasserstoffperoxid-Oxydoreduktase (EC 1.11.1.7)

PFK = Phosphofructokinase, ATP:D-Fructose-6-phosphat-1-Phosphotransferase (EC 2.7.1.11)

Phosphoglycerat-Kinase, ATP:3-Phospho-D-glycerat-1-Phosphotransferase (EC 2.7.2.3)

ENOL = Phosphopyruvat-Hydratase, 2-Phospho-D-glycerat-Hydro-Lyase (EC 4.2.1.11)

Pyr-DK = Pyruvat-Decarboxylase, 2-Oxosäure-Carboxy-Lyase (EC 4.1.1.1)

PK = Pyruvatkinase, ATP:Pyruvat-Phosphotransferase
(EC 2.7.1.40)

TIM = Triosephosphat-Isomerase, D-Glycerinaldehyd-3-
phosphat-Ketol-Isomerase (EC 5.3.1.1)

Zusammenfassung

Zellen von *E. coli*, die unter Mg-Mangelbedingungen gewachsen sind, haben einen wesentlich geringeren Mg-Gehalt. Mg-arm gewachsene Bakterien zeigen mannigfaltige Veränderungen im Zellstoffwechsel. Mg-arm gewachsene Zellen bauen aerob und anaerob nur etwa halb so viel Glukose ab wie Mg-reich gewachsene Kontrollzellen. Die Ursache hierfür ist eine verminderte Glucosepermease-Aktivität.

Die Enzymsynthese bei Mg-armen Zellen wird unterschiedlich beeinflusst. Die Aktivitäten der Hexokinase, Phosphofruktokinase und Pyruvatkinase sind in Mg-armen Zellen erhöht, die Aktivitäten der Pyruvat-Dekarboxylase und Glycero-phosphat-Dehydrogenase stark erniedrigt. Zur Erklärung werden "Katabolit-Repression" und das "ambiguity"-Phänomen herangezogen.

Mg-arm gewachsene Zellen zeigen eine verminderte Atmung. Der Pasteur-Effekt ist nahezu aufgehoben. Bei Mg-arm gewachsenen Bakterien ist der aktive K-Transport unter aeroben und anaeroben Bedingungen gehemmt. Die Hemmung des K-Transportes läßt sich mit einer Entkopplung, der oxydativen Phosphorylierung erklären, die wahrscheinlich auf einem Mangel an Kopplungsfaktoren beruht.

Diese Stoffwechseländerungen treten nur bei Mg-Mangel auf. Sie sind reversibel und verschwinden nach Wachsen in Mg-haltigen Medien.

- 11) Walser, M. Ergebn. der Physiol.,
biol. Chem. exp. Pharmacol.
59, 185 (1967)

- 12) Günther, Th.,
 Mariß, P. in Vorbereitung

- 13) Hagihira, H.,
 Wilson, T.H.,
 Lin, E.C.C. Biochim. biophysica Acta
(Amsterdam)
78, 505 (1963)

- Hoffee, P.,
 Englesberg, E.,
 Lamy, F. Biochim. biophysica Acta
(Amsterdam)
79, 337 (1964)

- 14) Hempfling, W.P.,
 Höfer, M.,
 Harris, E.J.,
 Pressman, R.C. Biochim. biophysica Acta
(Amsterdam)
141, 391 (1967)

- 15) Günther, Th.,
 Dorn, F. Z. Naturforschung
21b, 1082 (1966)

- 16) Atkinson, D.L.,
 Walton, G.M. J. biol. Chemistry.
240, 757 (1965)

- 17) Blangy, D.,
 Ruc, H.,
 Monod, J. J. Mol. Biol.
31, 13 (1968)

- 18) Mansour, M. J. biol. Chemistry
238, 2285 (1963)

- 19) Salas, M. L.,
 Vinuela, E.,
 Salas, M.,
 Sola, A. Biochem. biophysica Res. Commun.
19, 371 (1965)

- 20) Hess, B.,
Haeckel, R.,
Brand, K. Biochem. biophysic. Res. Commun.
24, 824 (1966)
- 21) Hempfling, W.P. in W. Chance et al.
Control of Energy Metabolism,
p. 360, Academic Press,
New York 1965
- 22) Kundig, W.,
Kundig, F.D.,
Anderson, B.,
Roseman, S. J. biol. Chemistry
241, 3243 (1966)
- 23) Barry Egan, J.,
Morse, M.L. Biochim. biophysica Acta
(Amsterdam)
97, 310 (1965)
- 24) Kotyk, A.,
Kleinzeller, A. Biochim. biophysica Acta
(Amsterdam)
135, 106 (1967)
- 25) Pinchet, G.B. Federat. Proc.
22, 1076 (1963)
- 26) Günther, Th.,
Dorn, F. Z. Naturforschung
21b, 1076 (1966)
- 27) Bricker, F.S.,
Klahr, S. J. gen. Physiol.
49, 483 (1966)
- 28) Cooper, C.,
Lehninger, A.L. J. biol. Chemistry
224, 547 (1957)
- 29) Klemperer, H.G. Biochim. biophysica Acta
(Amsterdam)
23, 404 (1957)

- 30) Witter, R.F.,
Newcomb, E.H.,
Stotz, E. J. biol. Chemistry
202, 291 (1952)
- 31) Günther, Th.,
Nolten, W. unveröffentlicht
- 32) Weiden, P.L.,
Epstein, W.,
Schultz, S.G. J. gen. Physiol.
50, 1641 (1967)
- 33) Kachmar, J.F.,
Boyer, P.D. J. biol. Chemistry
200, 669 (1953)
- 34) van Korff, R.W. J. biol. Chemistry
203, 265 (1953)
- 35) Latzko, E. Biochim. biophysica Acta
(Amsterdam)
47, 350 (1961)
- 36) Lubin, M. Federat. Proc.
23, 994 (1964)
- 37) Holzer, H.,
Grunicke, H. Biochim. biophysica Acta
(Amsterdam)
53, 591 (1961)
- 38) Magasanik, B. Cold Spring Harbor Sympos.
quantitat. Biol.
26, 249 (1961)
- 39) Grünberg-Manago, M.,
Dondon, F. Biochem. biophysic. Res. Commun.
18, 517 (1965)
- 40) Friedman B.,
Weinstein, I.B. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.
52, 988 (1964)
- 41) Tissières, A.,
Schlesinger, D.,
Gros, F. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.
46, 1450 (1960)

- 42) Marchesi, S.L.,
Kennell, D. J. Bacteriol.
93, 357 (1967)
- 43) Günther, Th. Z. Naturforschung
21b, 1174 (1966)
- 44) Sachs, H. J. biol. Chemistry
228, 23 (1957)
- 45) MacIntyre, I.,
Davidsson, D. Biochem. J.
70, 456 (1958)
- 46) Orange, M.,
Rhein, H.C. J. biol. Chemistry
189, 379 (1951)
- 47) Gruber, W.,
Moellering, H. Biochem. Z.
346, 85 (1966)
- 48) Fiske, C.H.,
Subbarow, Y. J. biol. Chemistry
66, 375 (1925)
- 49) Holzer, H.,
Busch, D.,
Kröger, H. Hoppe-Seyler's Z.f.Physiol.Chemie
313, 184 (1958)
- 50) Berker, S.B.,
Summerson, W.H. J. biol. Chemistry
138, 535 (1941)
- 51) Hopton, J.W. Analytica chim. Acta
(Amsterdam)
8, 429 (1953)
- 52) Lowry, O.H.,
Rosebrough, N.J.,
Farr, A.J.,
Randall, R.J. J. biol. Chemistry
193, 265 (1951)

Herrn Privat-Dozenten Dr. med. Th. Günther
möchte ich für die Überlassung des Themas
sowie seine Beratung und Unterstützung
danken.

L e b e n s l a u f

Am 12. Juni 1943 wurde ich, Peter Mariß, in Berlin als erstes von drei Kindern des damaligen Lehrers und heutigen Rektors Adolf Mariß und seiner Ehefrau Hildegard geb. Wendel geboren. Im Dezember 1943 evakuierten meine Eltern nach Lippe-Detmold, der Heimat meines Vaters, wo wir seit dem wohnen. 1946 wurde mein Bruder Gert, 1949 meine Schwester Ingrid geboren.

1949 wurde ich in die Volksschule Elbrinxen eingeschult. 1954 wechselte ich auf das Mathematisch-Naturwissenschaftliche Gymnasium Blomberg über, an dem ich im März 1963 die Reifeprüfung bestand.

Im Sommersemester 1963 immatrikulierte ich mich an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin. Im März 1964 legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im Oktober 1965 die ärztliche Vorprüfung ab. Vom 5. bis 11. Semester war ich als studentische Hilfskraft im Physiologisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin beschäftigt. Während dieser Zeit verfertigte ich unter Leitung von Herrn Privat-Dozenten Dr.med. Theodor Günther meine Dissertationsarbeit mit dem Thema "Biochemische Untersuchungen an Mg-arm gewachsenen Zellen von E. coli". Im Wintersemester 1968/69 bestand ich die ärztliche Prüfung. Am 27. Dezember 1968 heiratete ich Fräulein Karin Schlingmann aus Bad Meinberg.

Vom 1. April bis 30. November 1969 werde ich als Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft Ausbildungskurse in Berlin und Karlsruhe besuchen. Anschließend beabsichtige ich, am Kreis Krankenhaus Detmold meine Medizinalassistentenzeit zu absolvieren.

